

氏 名 かさい やすゆき **葛西 康之**

学 位 の 種 類 博士（薬学）

学 位 記 番 号 富医薬博甲第146号

学位授与年月日 平成 26 年 9 月 5 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 薬学領域 博士課程
生命薬科学専攻

学 位 論 文 題 目 グアニジノ化合物及び D-serine の脳からの血液脳脊髄液関門を介
した排出輸送機構

論 文 審 査 委 員

（主査）	教 授	細谷 健一（指導教員）
（副査）	教 授	藤 秀人
（副査）	准教授	安東 嗣修

論文内容の要旨

記憶や学習などの高次脳機能における L-glutamate 介在の興奮性神経伝達の関与が報告されている。代表的な L-glutamate 受容体である N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型 L-glutamate 受容体は、L-glutamate 結合部位だけではなく glycine 結合部位を有しており、共役するイオンチャネルの開口による Na^+ 、 K^+ または Ca^{2+} の流入を介して興奮性神経伝達を誘発する。近年、NMDA 型 L-glutamate 受容体の活性には L-glutamate や glycine 以外の有機化合物が影響を与えていることが明らかとなっている。Creatinine、guanidinosuccinic acid (GSA) 及び guanidinoacetic acid (GAA) など、一部のグアニジノ化合物 (GC) は、NMDA 型 L-glutamate 受容体を活性化させる。腎排泄型 GC である creatinine 及び GSA は腎不全患者の生体内に蓄積し、その結果血漿中濃度に加えて脳内濃度が上昇することで、NMDA 型 L-glutamate 受容体の過剰な活性化に起因する痙攣発作を誘発すると考えられている。GAA は guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT) を介しエネルギー貯蔵物質である creatine に変換される。一方、GAMT を先天的に欠損したヒトでは痙攣発作が認められ、そのメカニズムとして脳における GAA 過剰蓄積が示唆されている。以上のように、脳内 GC 過剰蓄積は、過剰な興奮性神経伝達に伴う痙攣誘発に関係する。GC と同様に、NMDA 受容体の機能調節因子として、脳内に豊富に存在するアミノ酸である D-serine が知られている。D-Serine の脳内過剰蓄積は、NMDA 型 L-glutamate 受容体の過剰興奮を介した脳虚血及び神経変性疾患時における神経細胞死誘発に関与する一方、D-serine の脳内濃度の低下は統合失調症の発症との関連が示唆されている。以上から、各種疾患時における NMDA 型 L-glutamate 受容体を介した中枢神経系生理機能変動を考える上で、GC である creatinine と GSA、GAA、そして D-serine は重要な化合物であると言える。

Creatinine、GSA、GAA 及び D-serine の過剰蓄積を回避するため、何らかの除去機構を脳は備えていると考えられる。一般的に、脳内の有機化合物除去機構として、代謝と脳から循環血液中への排出輸送が挙げられる。脳におけるこれら物質の代謝機構としては、GAA は GAMT を介し、D-serine は D-amino acid oxidase (DAO) を介し代謝されることが報告されている。一方、GAMT は一部のヒトにおける遺伝的な欠損が報告されており、DAO は脳において前脳部には発現していないことが示されている。さらに、creatinine 及び GSA は生体内における最終代謝物である。従って、creatinine、GSA、GAA 及び D-serine の脳内の濃度調節を考える上で、代謝だけではなく、脳からの消失機構を解明することは重要である。

これまでに、脳からの物質消失への血液脳関門 (BBB) と血液脳脊髄液関門 (BCSFB) の役割が明らかにされてきている。BBB 及び BCSFB はその形質膜上に局在する様々な輸送担体を介し、循環血液から脳への物質供給のみならず、脳から循環血液への有機化合物排出を行っている。その中でも、BCSFB は脳脊髄液 (CSF) からの物質消失を担い、様々な薬物・化合物の脳外除去に寄与することが報告されている。さらに、BCSFB の実体細胞である脈絡叢上皮細胞は、CSF からの物質取り込みに関与する各種輸送担体に加え、DAO 等の内因性化合物を代謝する酵素が高発現している。従って、GC や D-serine の脳からの消失機構を考える上で、BCSFB を介した CSF からの除去は何らかの役割を果たしている可能性が高い。本研究は NMDA 型 L-glutamate 受容体の機能に関与するこれらの有機化合物の BCSFB を介した輸送機能を解明することを目的とした。

1. 血液脳脊髄液関門を介した creatinine 排出輸送機構の解明¹⁾

Creatinine は有機カチオン性 GC であり、その脳内蓄積は尿毒症患者における痙攣発作等の神経症状の一因であると考えられている。そのため、脳内や CSF 中からの creatinine 消失機構解明は尿毒症患者における神経症状の改善に繋がると期待される。過去の *in vivo* 輸送解析から、creatinine は BBB を介して排出輸送されず、CSF から bulk flow とは異なる経路で速やかに消失することが明らかとされている。そこで、本研究は CSF からの creatinine 消失への BCSFB の寄与とそれを担う分

子実体を明らかにすることを目的とした。

ラット BCSFB の実体組織である脈絡叢を単離し、放射性同位元素標識 creatinine の輸送を評価した。その結果、本取り込みは非標識 creatinine 共存にて有意に阻害され、ラット単離脈絡叢への creatinine 取り込みは担体介在型であることが示唆された。ラット単離脈絡叢 total RNA をソースとした RT-PCR 解析の結果、GC の一つである creatine を認識する creatine transporter (CRT) 及び有機カチオン性化合物を認識する organic cation transporter 3 (OCT3) の mRNA 発現が示された。本結果から、CRT 及び OCT3 が BCSFB における creatinine 輸送候補と考えられ、これらの分子を介した creatinine 輸送能を、単分子発現系にて評価した。CRT を発現させた HEK293 細胞及び OCT3 を発現させた *Xenopus Laevis* oocyte への creatinine 取り込みは濃度依存性を示し、その取り込みは CRT 及び OCT3 の基質によってそれぞれ阻害されたことから、creatinine が CRT 及び OCT3 の基質であることが示唆された。これら分子のラット単離脈絡叢への creatinine 輸送に対する関与を輸送解析にて検証した。ラット単離脈絡叢への creatinine 取り込みは CRT 及び OCT3 の基質及び阻害剤によってそれぞれ有意に阻害され、事前に OCT3-antisense oligonucleotides 投与にて OCT3 発現を knockdown したラット単離脈絡叢への creatinine 取り込みもまた有意に減少した。以上の結果から、creatinine の CSF からの消失には一部 BCSFB が寄与し、CRT 及び OCT3 がその過程を担う分子であることが示唆された。

2. 血液脳関門を介した GAA 排出輸送機能の評価及び血液脳脊髄液関門を介した輸送特性との比較²⁾

GAMT を欠損したヒトにおいて認められる脳への GAA 過剰蓄積は痙攣発作誘発に繋がることから、脳内 GAA 濃度は厳密に制御されている可能性が高い。GAA の CSF からの消失には一部 BCSFB が寄与し、その過程には CRT が関与することが明らかにされている。一方、もう一つの脳関門である BBB を介した GAA 輸送機能は未だ不明である。本研究は、BBB を介した GAA 輸送機能を明らかにすることで、脳内 GAA 除去への脳関門の役割を明らかにすることを目的とした。

ラット BBB の実体細胞である脳毛細血管内皮細胞のモデル細胞株 (TR-BBB13 細胞) への GAA 輸送は濃度依存性を示し、BBB における GAA 輸送は担体介在型であることが示唆された。また、本細胞への GAA 輸送は CRT 基質・阻害剤にて約 70% 阻害される一方、GAA と同様に両性イオン型化合物である taurine では阻害されなかった。従って、BBB における GAA 輸送を担うのは主に CRT であることが示唆された。この *in vitro* にて示された CRT 介在 GAA 輸送の生体における役割を明らかにするため、各種 *in vivo* 輸送実験を実施した。循環血液中から脳への GAA 輸送をラット integration plot 法にて評価した結果、脳への GAA の透過が示され、その透過クリアランスは $1.27 \mu\text{L}/(\text{min} \cdot \text{g brain})$ であった。一方、脳から循環血液中への GAA 輸送をラット brain efflux index 法を用いて解析した結果、BBB を介した GAA 排出輸送は観察されなかった。以上のことを総合すると、BBB 及び BCSFB 共に GAA 輸送を担うのは CRT であるものの、BBB に発現する CRT は循環血液中から脳への GAA 輸送に、BCSFB に発現する CRT は脳/CSF からの GAA 排出輸送に関与すること、即ちそれぞれの関門は脳内 GAA 動態について役割が分担されていることが示唆された。

3. GSA の脳内動態における CSF からの消失機能の重要性⁴⁾

GSA は強い痙攣誘発作用を有していることから、creatinine と同様に腎不全患者における痙攣発作の一因であると考えられている。ヒトにおいて、CSF 中 GSA 濃度は循環血液中 GSA 濃度と比較して低値であることが報告されていることから、何らかの GSA の脳外除去機構の存在が示唆される。これまでの研究において GSA と同様に GC である creatinine 及び GAA の脳外除去には BCSFB が役割を果たすことが示唆されてきた。脳内の GSA 濃度の調節機構として BCSFB が重要と考えられたことから、本研究はその検証を目的に、*in vivo* 循環血液-CSF 間の GSA 輸送を評価した。

シスプラチンを腹腔内投与することで作出した急性腎障害モデルラットにおける、GSA の静脈内投

与 60 分後における見かけの循環血液-CSF 分配係数は、正常ラットと比較して変化しなかった。従って、循環血液-CSF 間の GSA 濃度平衡は腎障害時においても一定であることが示唆された。脳室内に投与した GSA は速やかに CSF から消失し、その消失クリアランス ($15.5 \mu\text{L}/(\text{min}\cdot\text{rat})$) は循環血液から CSF への透過クリアランス ($0.176 \mu\text{L}/(\text{min}\cdot\text{rat})$) と比較して約 88 倍高値であった。本結果から、BCSFB を介した排出輸送を含めた CSF からの GSA 消失機構は、正常時及び腎障害時共に、循環血液中と比較して CSF 中 GSA 濃度を低く保つために機能していることが示唆された。

4. 血液脳脊髄液関門を介した D-serine 排出輸送機構の解明³⁾

興奮性神経伝達を調節する D-serine の脳外への除去機構として、脳関門を介した排出輸送が挙げられる。特に、D-serine 不活化酵素である DAO が高発現している BCSFB の実体細胞である脈絡叢上皮細胞への取り込み・輸送が役割を果たす可能性が高い。本研究は、脳関門における D-serine 排出輸送機能を *in vivo* にて評価すると共に、その過程を担う分子実体を明らかにすることを目的とした。

BBB を介した排出機能を brain efflux index 法にて評価した結果、BBB を介した D-serine 排出輸送は観察されなかった。一方、脳室内に投与した D-serine は CSF から速やかに消失し、その消失クリアランスは、CSF の bulk flow を反映する D-mannitol の消失クリアランスと比較し約 4 倍高値であった。従って、脳内/CSF 中 D-serine の除去には BBB ではなく BCSFB が主に寄与することが示唆された。これまでに D-serine は Na^+ 非依存性の asc-type amino acid transporter 1 (Asc-1) や Na^+ 依存性の alanine-serine-cysteine transporters (ASCTs) の輸送基質であることが報告されている。ラット単離脈絡叢への D-serine 取り込みは、Asc-1 基質によって有意に阻害され、 Na^+ 非存在条件による影響を受けなかった。RT-PCR 解析の結果、ラット脈絡叢における Asc-1 mRNA 発現が示された。以上の結果から、CSF から BCSFB 実体細胞である脈絡叢上皮細胞への D-serine 取り込みには Asc-1 が関与することが示唆された。

結論

NMDA 型 L-glutamate 受容体の機能に影響を与える化合物である creatinine、GAA、GSA 及び D-serine の脳外除去について、BCSFB を介した CSF からの消失機能が重要であることが明らかとなった。また、BCSFB に発現する OCT3 及び CRT が CSF からの creatinine 消失に、Asc-1 が D-serine 消失にそれぞれ関与することが示唆された。これらの研究成果を元とし、脳における GC や D-serine の濃度調節が実現すると期待される。

参考文献

本要旨内容は、以下の論文にて公表した。

- 1) Tachikawa M., Kasai Y., Takahashi M., Fujinawa J., Kitaichi K., Terasaki T., Hosoya K. The blood-cerebrospinal fluid barrier is a major pathway of cerebral creatinine clearance: involvement of transporter-mediated process. *J. Neurochem.*, 107, 432-42 (2008)
- 2) Tachikawa M., Kasai Y., Yokoyama R., Fujinawa J., Ganapathy V., Terasaki T., Hosoya K. The blood-brain barrier transport and cerebral distribution of guanidinoacetate in rats: involvement of creatine and taurine transporters. *J. Neurochem.*, 111, 499-509 (2009)
- 3) Kasai Y., Tachikawa M., Hirose S., Akanuma S., Hosoya K. Transport systems of serine at the brain barriers and in brain parenchymal cells. *J. Neurochem.*, 118, 304-13 (2011)
- 4) Kasai Y., Akanuma S., Kubo Y., Tachikawa M., Hosoya K. Pharmacokinetics of guanidinosuccinic acid in rat blood and cerebrospinal fluid. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 29, 97-100 (2014)

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

興奮性神経伝達物質であるL-glutamateが結合するN-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の亢進や機能減弱は、各種中枢神経系疾患の発症・進行に関連する。近年、L-glutamateに加え、creatinine (CTN), guanidinosuccinic acid (GSA) 及びguanidinoacetic acid (GAA) などの一部のグアニジノ化合物 (GC) やD-serineがNMDA受容体の活性に影響を与え、痙攣発作などの興奮性神経活動異常による症状を誘発することが報告されている。一方、正常時ではこれら化合物に起因する興奮性神経伝達異常は認められないことから、脳はGCやD-serineの除去機構を備えていると考えられる。一般に、脳内の物質除去機構として化合物の代謝と脳外除去が挙げられる。GAA及びD-serineは代謝に関与する酵素が知られているものの、GAA代謝酵素は一部のヒトでは遺伝的に欠損しており、D-serine代謝酵素は前脳部には発現していない。また、CTN及びGSAは代謝されることはない。そのため、これら化合物の脳外への除去を明らかにすることは重要である。これまで脳外への物質除去における血液脳関門 (BBB) と血液脳脊髄液関門 (BCSFB) の役割が明らかにされてきている。BBB及びBCSFBはその形質膜上に局在する輸送担体を介し、脳から循環血液への物質排出を担っている。その中でも、BCSFBの実体細胞である脈絡叢上皮細胞は輸送担体に加え、D-serine代謝酵素を含む各種代謝酵素を発現していることから、脳及び脳脊髄液 (CSF) からの物質消失を考える上でBCSFBは重要な関門であると考えられる。本研究はGCやD-serineの脳外除去機構とその過程へのBCSFBの関与の解明を目的とした。本研究の内容の骨子及び審査結果は次のとおりである。

BCSFB を介した CTN 排出輸送機構の解明

ラット単離脈絡叢への放射性同位元素標識CTN取り込みは非標識CTN共存にて有意に阻害され、輸送担体の関与が示唆された。RT-PCR解析の結果、ラット脈絡叢におけるcreatine transporter (CRT) 及びorganic cation transporter 3 (OCT3) のmRNA発現が示された。CRTを発現させたHEK293細胞及びOCT3を発現させた*Xenopus Laevis* oocyteへのCTN取り込み解析の結果、CTNがCRT及びOCT3の基質であることが示唆された。また、ラット単離脈絡叢へのCTN取り込みはCRT及びOCT3の阻害剤に有意に阻害され、OCT3-antisense oligodeoxynucleotides投与によるOCT3 knockdownによって減少した。以上から、CTNのCSFからの消失にはBCSFBに発現するCRT及びOCT3が一部関与することが明らかとなった。

BBB を介した GAA 排出輸送機能の評価及び BCSFB を介した輸送特性との比較

ラット BBB の実体細胞である脳毛細血管内皮細胞のモデル細胞株 (TR-BBB13 細胞) へのGAA輸送はCRT基質で約70%阻害され、RT-PCR解析にてTR-BBB13細胞におけるCRT mRNA発現が示された。従って、BBBにおいてGAA輸送を担うのはCRTであることが示唆された。静脈内に投与したGAAの循環血液から脳への移行クリ

アランスは, BBB 細胞間隙輸送の指標である D-mannitol と比較し約 2 倍高値であった。一方, 脳実質に投与した GAA の脳からの排出は示されなかった。これらの結果から, BBBにおいて CRTはGAAの循環血液から脳への移行を担っていることが示唆された。BCSFBに発現する CRTはCSFからのGAA消失に関与するという報告を考慮すると, BBB 及び BCSFB 共に GAA 輸送を担うのは CRT であるが, それぞれの関門は脳内 GAA 動態について役割が分担されていると考えられた。

GSA の脳内動態における CSF からの消失機能の重要性

シスプラチン投与にて作出した急性腎障害モデルラットに GSA を静脈内投与 60 分後の CSF/血漿中濃度比は正常ラットと比して有意な変化は認められず, 循環血液中濃度に伴い CSF 中 GSA 濃度は変動することが示唆された。脳室内に投与した GSA は CSF から消失し, その消失クリアランスは循環血液から CSF への移行クリアランスと比較し 88 倍高値であった。以上から, CSF からの GSA 消失機能が CSF 中 GSA 濃度調節及び GSA の脳外除去に寄与していると考えられた。

BCSFB を介した D-serine 排出輸送機構の解明

脳実質に投与した D-serine の消失は示されず, 脳室内に投与した D-serine は CSF から消失した。CSF からの消失クリアランスは CSF の bulk flow を反映する D-mannitol と比較し約 4 倍高値であったことから, 脳/CSF 中 D-serine の消失には BBB ではなく BCSFB が寄与すると考えられた。D-Serine は Na⁺非依存性の asc-type amino acid transporter (Asc-1) の基質であり, RT-PCR 解析の結果, ラット脈絡叢における Asc-1 mRNA 発現が示された。ラット単離脈絡叢への D-serine 取り込みは Asc-1 基質に阻害され, Na⁺依存性を示さなかった。以上から, CSF からの D-serine 消失には BCSFB に発現する Asc-1 が一部関与することが示唆された。

以上申請者は, NMDA 受容体の機能に影響を与える化合物である GC や D-serine の脳外除去について, BCSFB を介した CSF からの消失機能が重要であることを明らかにした。申請者が明らかにした消失機能、及びそれを担う分子実体は, GC や D-serine の脳内濃度調節を実現する上で、有用な知見と判断される。

主査および副査は, 葛西康之君に面接試験を行うとともに論文内容について審査を行い,博士(薬学)を授けるに値すると判定した。